TECHNICAL MANUAL

Y Chromosome AZF Analysis System

IVD

Dispositif médical
de diagnostic
in vitro

EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

CE

MODE D'EMPLOI
DU PRODUIT
MD1631

PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA

Printed in USA
Revised 3/14

Part# TM252

Y Chromosome AZF Analysis System

Promega

Manuel technique TM252

MODE D'EMPLOI DU PRODUIT MD1631.
Toute la documentation technique est disponible sur Internet à www.promega.com
Veuillez consulter le site Web pour vérifier que vous utilisez la version la plus à jour de ce manuel technique.

1. Application du produit 1

2. Description 2

3. Composants du produit 3

4.. Généralités 3
- A. Matrice d'ADN 3
- B. Conditions de PCR 4
- C. Thermocycleurs 4
- D. Contrôle de contamination 5
- E. Réactions du contrôle 5

5. Réactions d'amplification 5
- A. Préparation de la réaction 6
- B. Protocole optimal de cycles thermiques de PCR pour le thermocycleur Perkin-Elmer Model 480 8
- C. Électrophorèse sur gel d'agarose 8
- D. Analyse des données – Contrôles 9
- E. Analyse des données – Échantillons expérimentaux 10

6. Références 11

7. Annexe 11
- A. Composition des tampons et solutions 11
- B. Feuilles de résultats 12

EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre,
Allemagne

FRANÇAIS

1. Application du produit

Le Y Chromosome AZF Analysis System[a] satisfait aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Le Y Chromosome AZF Analysis System fournit une méthode basée sur la PCR multiplex permettant d'analyser l'intégrité de la région AZF du chromosome Y humain. Il convient d'utiliser le Y Chromosome AZF Analysis System dans le cadre d'un test diagnostique visant à caractériser l'infertilité masculine. Il convient d'interpréter les résultats diagnostiques obtenus à l'aide de ce système à la lumière des autres données cliniques ou de laboratoire disponibles. Cette information peut être utile pour les patients envisageant une procédure de fécondation in vitro car les délétions dans la région AZF du chromosome Y sont transmises à la descendance mâle. Cette transmission est consécutive à la fécondation in vitro, et entraîne une infertilité chez l'enfant.

2. Description

Le Y Chromosome AZF Analysis System fournit une méthode de détection de la région AZF du chromosome Y humain. Le système consiste en 20 paires d'amorces qui sont homologues à des sites STS (sequence-tagged sites, STS ; 1-7), précédemment identifiés et cartografiés. Ces amorces amplifient de courts segments d'ADN non polymorphes du chromosome Y lorsqu'ils sont utilisés dans des réactions de polymérisation en chaîne (PCR ; 6,8). Ces amorces ont été combinées en cinq jeux de Multiplex Master Mix en vue de leur utilisation dans la PCR multiplex. Ceci permet de déterminer la présence ou l'absence des 20 STS en effectuant simultanément cinq amplifications de PCR (figure 1). Les délétions du chromosome Y dans les régions amplifiées par ces jeux d'amorces ont été associées à l'infertilité masculine (1,2,6,9-17). Des régions adjacentes au chromosome Y n'apparaissent généralement pas comme produits d'amplification séquentielle lors d'une seule réaction d'amplification multiplex. SY242 et SY208 du locus DAZ, représentés comme produits d'amplification séquentielle lors des réactions utilisant le Multiplex B Master Mix, et SY84 et SY86 des loci DYS273 et DYS148, représentés comme produits d'amplification séquentielle dans les réactions de Multiplex E Master Mix constituent des exceptions.

Les Multiplex Master Mixes A-D contiennent une paire d'amorces de contrôle qui amplifie les fragments du locus SMCX lié à X. Le Multiplex E, le cinquième Multiplex Master Mix, contient une paire d'amorces de contrôle qui amplifie une région unique d'ADN (ZFX/ZFY) présente chez l'homme et la femme. Ces paires d'amorces de contrôle sont des contrôles internes pour les réactions d'amplification multiplex qui testent l'intégrité de l'échantillon d'ADN génomique. Enfin, le Multiplex E Master Mix comprend également une paire d'amorces qui amplifie une région du gène SRY, servant d'amplification de contrôle pour le gène TDF sur le bras court du chromosome Y humain.

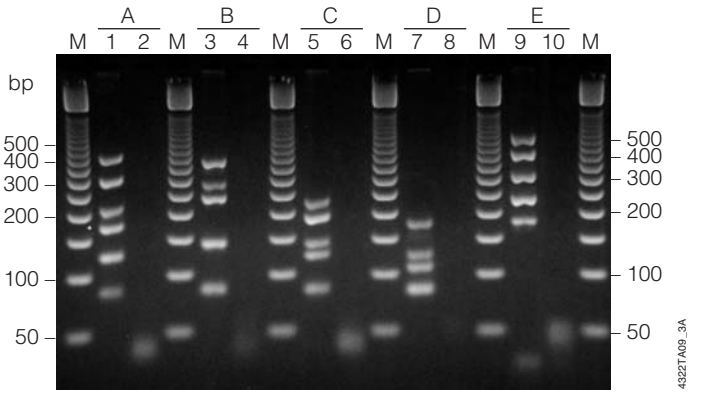
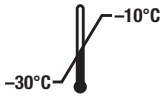


Figure 1. Exemple d'amplification d'ADN génomique mâle. Amplification d'ADN génomique mâle (MD115A) (lignes 1, 3, 5, 7, 9), ainsi que d'un contrôle d'ADN négatif (lignes 2, 4, 6, 8, 10) pour chacun des cinq Multiplex Master Mixes.

3. Composants du produit

Produit	Taille	Réf.
Y Chromosome AZF Analysis System	25 réactions	MD1631

Le Y Chromosome AZF Analysis System comprend :



•	MD154A	Multiplex A Master Mix	500 µl
•	MD155A	Multiplex B Master Mix	500 µl
•	MD156A	Multiplex C Master Mix	500 µl
•	MD157A	Multiplex D Master Mix	500 µl
•	MD158A	Multiplex E Master Mix	500 µl
•	M300C	GoTaq® DNA Polymerase(c)	200 u
•	P119F	Nuclease-Free Water	1,25 ml
•	G452C	50bp DNA Step Ladder (340 ng/µl)	90 µg
•	MD115A	Male Genomic DNA (50 ng/µl)	2,5 µg
•	G190B	Blue/Orange 6X Loading Dye	1 ml

Conditions de conservation : Conserver tous les composants de –10 à –30°C. Éviter les cycles de congélation-décongélation répétés.

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

4. Généralités

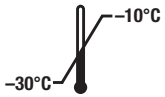
A. Matrice d'ADN

La concentration d'ADN, la pureté et la taille sont d'importantes considérations permettant de garantir une bonne réussite lors de l'utilisation du Y Chromosome AZF Analysis System. Un ADN de qualité médiocre peut entraîner une augmentation du bruit de fond ou conduire à un échec de l'amplification. Un échec de l'amplification peut se manifester par un manque total d'amplification de toutes les bandes avec tous les Mutiplex Master Mixes ou par la perte de sous-populations des allèles de mélanges maîtres individuels. Pour éviter ceci, utiliser exclusivement de l'ADN de haute qualité avec un rapport d'absorbance de A_{260}/A_{280} ≥1,8. L'ADN ne doit pas être tronqué et doit être exempt de protéine contaminante, d'éthanol ou de sels (en particulier l'EDTA; la concentration de l'EDTA doit être < à 0,4 mM).

Quantifier l'ADN avant de l'utiliser avec le Y Chromosome AZF Analysis System, car l'ajout de trop ou de trop peu d'ADN peut faire échouer les réactions. Des lectures spectrophotométriques (d'absorbance) à 260 nm (A_{260}) peuvent être utilisées pour estimer la concentration d'ADN où 1 Å = 50 µg d'ADN bicaténaire / ml. Utiliser cinquante nanogrammes d'ADN dans chaque réaction d'amplification par PCR multiplex. La concentration d'ADN peut être surestimée par la spectrophotométrie si le rapport A_{260}/A_{280} est trop faible ou si la valeur d'absorbance est faible (inférieure à 0,1).

Légende des symboles

Dispositif médical de diagnostic in vitro



Conserver de –10 à –30°C

Contenu suffisant pour « n » tests

Représentant autorisé

FRANÇAIS

B. Conditions de PCR

Des gradients de concentration peuvent se former dans les Multiplex Master Mixes conservés à -20 °C. Une fois décongelé conformément aux instructions, vortexer chaque tube pendant 10 à 15 secondes avant emploi. Préchauffer l'instrument à 94 °C avant de placer les tubes à l'intérieur. Ne pas utiliser plus de 1 unité de GoTaq® DNA Polymerase par réaction d'amplification par PCR multiplex. En utilisant le Y Chromosome AZF Analysis System, les volumes standard de PCR finaux sont de 25 µl. Des volumes de PCR de 12,5 µl peuvent entraîner la perte de multiples bandes et ne doivent pas être utilisés.

C. Thermocycleurs

Le Y Chromosome AZF Analysis System a été développé à l'aide du thermocycleur Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480. L'utilisation d'autres thermocycleurs impose l'optimisation et la validation du protocole par l'utilisateur.

Utiliser uniquement des tubes à paroi fine pour l'amplification par PCR. Pour le thermocycleur Perkin-Elmer Model 480, utiliser des tubes à paroi fine GeneAmp® de 0,5 ml.

1. Thermocycleurs à couvercles chauffés vs. thermocycleurs à couvercles non chauffés.

   Les thermocycleurs sont disponibles soit avec couvercles chauffés soit avec couvercles non chauffés. En ce qui concerne les thermocycleurs à couvercles non chauffés (par ex. le Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480), une couche d'huile minérale de la réaction est nécessaire pour empêcher l'évaporation de la réaction lors du cycle thermique. Pour les thermocycleurs à couvercles chauffés, la couche d'huile minérale n'est pas nécessaire. Le couvercle chauffé de ces thermocycleurs empêche l'évaporation de la réaction lors du cycle thermique. Toutefois, assurez-vous que le couvercle chauffé fonctionne correctement. Si vos tubes à réaction amplifiés dans un thermocycleur à couvercle chauffé présentent de la condensation au niveau du couvercle et autour de la partie supérieure du tube, ceci indique que le couvercle chauffé ne fonctionne pas correctement et une mauvaise performance des amplifications du système peut en résulter. **Si vous n'êtes pas certain de l'étalonnage de votre couvercle chauffé ou observez une condensation dans le tube, ajoutez une couche d'huile minérale.**

2. Vitesse de montée du chauffage/refroidissement d'un thermocycleur.

   La durée d'un cycle d'un thermocycleur entre les températures de dénaturation, d'hybridation et d'extension des profils de cycles thermiques de PCR (souvent appelée « période de montée ») peut altérer l'efficacité de l'amplification par PCR. La vitesse de cycle d'un thermocycleur entre les températures d'un profil de cycle thermique de PCR dépend de sa fabrication. Le protocole de cycles de PCR fourni a été optimisé pour le thermocycleur Perkin-Elmer Model 480. L'utilisation d'autres thermocycleurs impose aux utilisateurs de valider les périodes de montée.

3. Étalonnage de l'équipement.

   La réussite de l'amplification par PCR, en particulier dans le cas de la PCR multiplex, dépend de l'exactitude du cycle thermique. Assurez-vous que l'équipement du thermocycleur que vous utilisez avec le Y Chromosome AZF Analysis System est étalonné.

D. Contrôle de contamination

Il est primordial d'empêcher la contamination de l'ADN des composants de la réaction. Pour éviter toute contamination, les zones de pré- et post-amplification doivent être isolées, et ceci de préférence dans des pièces séparées. Toujours utiliser des cônes de pipette anti-aérosol, des pipettes dédiées spécialement aux mélanges des réactions, des gants jetables propres et éviter de rapporter des contaminations des solutions mères. Les postes de travail et pipettes doivent être nettoyés avec une solution légèrement javellisée avant et après utilisation.

E. Réactions du contrôle

Des réactions de contrôle adéquates doivent être comprises avec chaque expérience.

1. Des réactions d'amplification utilisant le contrôle positif Male Genomic DNA fourni comme matrice doivent être toujours effectuées en parallèle avec des échantillons. L'amplification par PCR du contrôle positif Male Genomic DNA fourni doit toujours donner les produits d'amplification anticipés (voir le tableau 1, à la section 7.B, pour les tailles anticipées).
2. Une réaction d'amplification par PCR de contrôle négatif sans ADN doit toujours être effectuée en parallèle avec des échantillons pour vérifier que les réactifs ne sont pas contaminés par de l'ADN. Une amplification par PCR de contrôle sans ADN ne doit donner aucuns produits d'amplification.

5. Réactions d'amplification

Matériel devant être fourni par l'utilisateur
(Les compositions des solutions sont fournies dans l'annexe, à la section 7.A.)

- huile minérale légère exempte de nucléase
- thermocycleur
- tubes d'amplification à paroi fine
  - Pour le thermocycleur Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480, utiliser des tubes GeneAmp® de 0,5 ml à paroi fine (Applied Biosystems référence N801-0737, N801-0611 ou N801-0537)
- gel d'agarose prémoulé : 4 % de NuSieve® à 3:1 plus des minigels Reliant® prémoulés d'agarose tampon TBE (Cambrex référence 54927, 54928 ou 54929)
- 1X tampon TBE
- bromure d'éthidium
- cônes de pipettes résistants à l'aérosol
- transilluminateur UV

A. Préparation de la réaction

Voir la figure 2 pour obtenir un résumé de l'organigramme du protocole de préparation de la réaction. Lors de cette procédure, des aliquotes d'ADN échantillons sont placés dans un tube à réaction. Séparément, la *Taq* DNA polymerase est ajoutée à chacun des Multiplex Master Mixes. Ensuite, le Multiplex Master Mix contenant la *Taq* DNA polymérase est ajoutée aux tubes contenant l'ADN échantillon. Chaque échantillon d'ADN est analysé à l'aide de chacun des Multiplex Master Mixes.

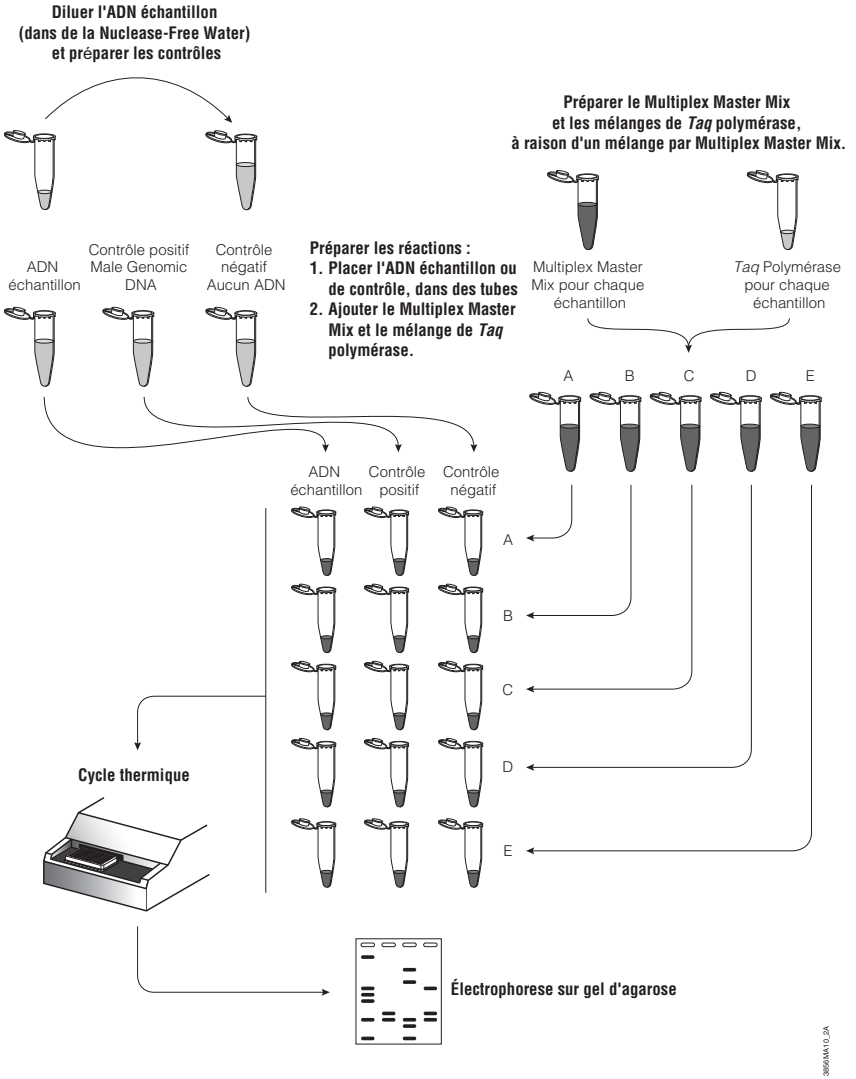


Figure 2. Représentation schématique du test Y Chromosome AZF Analysis System.

1. Décongeler les Multiplex Master Mixes, la Nuclease-Free Water et le Male Genomic DNA dans la glace. Une fois décongelés, les conserver dans la glace. Vortexer les Multiplex Master Mixes pendant 5 à 10 secondes avant emploi.

2. Remplir le tableau ci-dessous pour déterminer le nombre de réactions pour chaque Multiplex Master Mix. Il y aura cinq tubes pour chaque échantillon d'ADN, un pour chaque Multiplex Master Mix. Inclure un contrôle positif Male Genomic DNA et un contrôle négatif sans ADN pour chaque Multiplex Master Mix.

Multiplex Master Mix	Nbre de d'ADN échantillons	Contrôles positifs Male Genomic DNA	Contrôles négatifs sans ADN	Total des tubes de réaction
A		1	1	
B		1	1	
C		1	1	
D		1	1	
E		1	1	

3. Préparer et étiqueter le nombre requis de tubes comme spécifié ci-dessus. Utiliser des tubes d'amplification à paroi fine. Placer les tubes dans de la glace.

4. Dans un tube à part, diluer chaque ADN échantillon à 10 ng/µl à l'aide de la Nuclease-Free Water fournie. Bien mélanger en vortexant pendant 5 à 10 secondes. Ajouter 5 µl d'ADN dilué aux tubes correctement étiquetés sur glace.

   Échantillon d'ADN contrôle positif : Pour l'échantillon Male Genomic DNA contrôle positif, diluer le Male Genomic DNA à 10 ng/µl en ajoutant 6 µl de Male Genomic DNA à 24 µl de Nuclease-Free Water. Bien mélanger en vortexant pendant 5 à 10 secondes. Ajouter 5 µl aux tubes correctement étiquetés sur glace.

   Échantillon sans ADN contrôle négatif : Pour le contrôle négatif (sans ADN), ajouter 5 µl de Nuclease-Free Water aux tubes correctement étiquetés sur glace.

5. Préparer cinq mélanges de Multiplex Master Mix/GoTaq® DNA polymérase sur glace, à raison d'un mélange par Multiplex Master Mix. Vortexer les Multiplex Master Mixes avant de les utiliser.

Composant	Volume par réaction	Volume pour 10 réactions
Multiplex Master Mix	20 µl	200 µl
GoTaq® DNA polymérase (5u/µl)	0,2 µl	2 µl
volume final	**20,2 µl**	**202 µl**

6. Vortexer pour mélanger.

7. Ajouter 20 µl du mélange de Multiplex Master Mix/GoTaq® DNA polymérase aux tubes appropriés contenant l'ADN échantillon ou les contrôles, et ceci sur la glace.

8. Vortexer délicatement pour mélanger.

9. Centrifuger les tubes brièvement pour faire descendre le contenu au fond des tubes. Placer les tubes sur la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à effectuer le cycle thermique.

10. Les thermocycleurs sans couvercles chauffés (par exemple, le Perkin-Elmer Model 480 thermal cycler) ont besoin d'une couche d'huile minérale sur les réactions en tube. Incliner les tubes et ajouter une goutte d'huile sur le côté du tube, en laissant l'huile couler le long du tube.

B. Protocole optimal de cycles thermiques de PCR pour le thermocycleur Perkin-Elmer Model 480

Le protocole ci-dessous a été optimisé pour le thermocycleur Perkin-Elmer Model 480. L'utilisateur est responsable de l'optimisation et de la validation du protocole s'il utilise un autre thermocycleur.

Il est crucial de préchauffer l'instrument à 94 °C avant de placer les tubes dans la machine.

Thermocycleur	Tubes	ADN polymérase	Conditions de PCR
Model 480	Tubes GeneAmp® de 0,5 ml à paroi fine	GoTaq® DNA Polymerase	94 °C pendant 2 minutes, puis : 94°C pendant 1 minute 57°C, pendant 30 secondes 72°C pendant 1 minute Répéter l'opération pendant 35 cycles, puis : 72 °C pendant 5 minutes Trempage à 4 °C

C. Électrophorèse sur gel d'agarose

4 % de NuSieve® à 3:1 plus des minigels Reliant® prémoulés de tampon TBE (Cambrex référence 54927, 54928 ou 54929) sont requis pour l'électrophorèse et une visualisation ultérieure optimale des produits d'amplification.

1. Diluer le marqueur de poids moléculaire de la manière suivante :

Composant	Volume
50bp DNA Step Ladder	12 µl
Blue/Orange 6X Loading Dye	4 µl
Nuclease-Free Water	8 µl

2. Ajouter 2,5 µl de Blue/Orange 6X Loading Dye à chaque tube d'amplification et mélanger.
3. Charger le premier puits du gel avec 10 µl de marqueur de poids moléculaire dilué.
4. Charger chaque puits avec 10 µl de chaque échantillon.
5. Charger le dernier puits du gel avec 10 µl de marqueur de poids moléculaire dilué.
6. Faire migrer le gel dans du tampon TBE 1X contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium à une vitesse de 5V/cm (mesuré comme la distance entre les électrodes) jusqu'à ce que le front avant du bleu de bromophénol migre jusqu'à l'autre extrémité du gel.
7. Photographier le gel à l'aide du transilluminateur UV (320 nm).

D. Analyse des données—Contrôles

Déterminer si les réactions de contrôle ont produit les résultats anticipés avant d'analyser vos échantillons. Les feuilles de résultats fournies (voir le tableau 1, à la section 7.B) peuvent être utilisées pour l'analyse des échantillons de contrôle et expérimentaux.

1. **Contrôle négatif sans ADN :** Il ne doit y avoir aucuns produits d'amplification spécifique dans les puits contenant les réactions de contrôles sans ADN négatifs. Des bandes de faible poids moléculaire ou des traînées (smears) résultant d'interactions d'amorces peuvent apparaître. Les résultats ne doivent pas être considérés valables si des produits d'amplification sont observés dans les réactions du contrôle négatif sans ADN. Ceci est indicateur de la présence d'ADN contaminant, et l'expérience doit être répétée avec soin pour éviter toute contamination.

2. **Contrôle d'ADN génomique mâle positif :** Le nombre et la taille des produits d'amplification pour chaque Multiplex Master Mix est indiqué dans le tableau 1 (section 7.B). La réaction du contrôle positif Male Genomic DNA pour chaque Multiplex Master Mix doit comporter toutes les bandes indiquées pour ce Multiplex Master Mix (section 7.B, tableau 1). Les tailles des produits d'amplification peuvent être estimées par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire de 50bp DNA Step Ladder ayant migré sur le gel. Si toutes les bandes anticipées ne sont pas présentes dans les réactions avec le contrôle positif Male Genomic DNA, ou s'il existe des bandes supplémentaires proéminentes, ceci est indicateur d'un problème lié aux réactifs d'amplification ou au thermocycleur. Les résultats ne doivent pas être considérés valables si tout produit d'amplification manque dans les réactions au contrôle positif Male Genomic DNA.

3. **Amorce de contrôle dans les Multiplex Master Mixes :** Dans les réactions Multiplex A, B, C et D Master Mix, le plus petit produit d'amplification (83 bp) doit être produit à partir d'un locus lié à X (SMCX). Dans le Multiplex E Master Mix, le plus grand produit d'amplification (496 bp) doit être engendré par les gènes ZFY/ZFX. L'absence de ces produits est indicatrice d'un problème avec cette amplification par PCR multiplex en question. Si ces bandes de contrôle sont présentes avec le contrôle positif Male Genomic DNA mais pas avec l'ADN échantillon, ceci suggère qu'il peut y avoir un problème avec l'ADN génomique utilisé comme matrice. Les problèmes avec l'ADN échantillon peuvent relever de : la présence d'impuretés, une quantification de l'ADN inexacte ou d'une dégradation de l'ADN. Vérifier la matrice ADN sur un gel d'agarose avant d'effectuer une nouvelle amplification. Effectuer de nouvelles amplifications à partir de n'importe quelles réactions d'ADN échantillon exemptes de produit de contrôle. Il peut être nécessaire d'isoler à nouveau l'ADN génomique matrice.

E. Analyse des données—Échantillons expérimentaux

Les feuilles de résultats fournies dans l'annexe, à la section 7.B, peuvent être utilisées pour l'analyse des échantillons expérimentaux. Déterminer la présence ou l'absence des produits de PCR anticipés (tableau 1, à la section 7.B). Une cartographie de tous les produits absents des réactions peut être dressée à l'aide de la feuille de résultats de la carte du chromosome Y (tableau 2, à la section 7.B). Toutes les délétions doivent être contiguës. Si de multiples bandes d'amplification manquent pour un échantillon, et que ces bandes ne correspondent pas à des régions adjacentes sur le chromosome Y (tableau 2, à la section 7.B), elles représentent la perte de bandes, mais ce ne sont pas des délétions. Dans ce cas, il convient de répéter le test. Si une seule bande d'amplification manque dans un échantillon, elle peut représenter la perte d'une bande ; il convient alors de répéter le test afin de confirmer que le locus n'amplifie pas. Veuillez noter qu'un locus présent dans un échantillon peut ne pas amplifier en cas de mutation dans l'un des sites de liaison de l'amorce pour le locus. Les résultats diagnostiques obtenus avec ce système doivent uniquement être interprétés à la lumière des autres données cliniques ou de laboratoire disponibles. La figure 3 présente un exemple d'analyse sur gel d'un ADN échantillon comportant une délétion du chromosome Y de la position 15 à 20 de la carte.

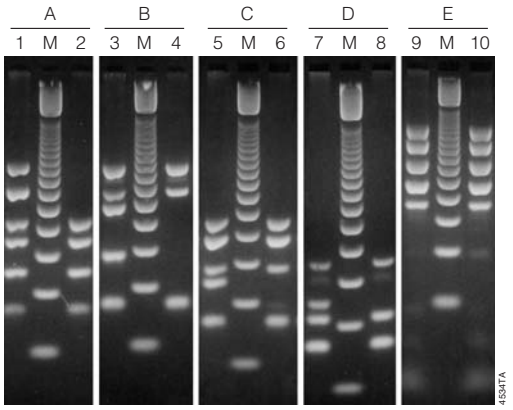


Figure 3. Exemple d'analyse sur gel de délétion du chromosome Y. Les produits d'amplification obtenus pour les réactions de Multiplex A-E Master Mix sont représentés. Chaque Multiplex Master Mix est utilisé pour l'amplification des échantillons de Male Genomic DNA (MD115A) (lignes 1, 3, 5, 7, 9) et un échantilllon représentatif contenant des délétions du chromosome Y (lignes 2, 4, 6, 8, 10). Les bandes issues de l'amplification du contrôle positif Male Genomic DNA sont comparées aux bandes résultant de l'amplification de l'ADN génomique test comportant des délétions du chromosome Y (notez les bandes délétées dans toutes ces lignes, excepté dans le cas du Multiplex E). Le marqueur (ligne M) est le 50bp DNA Step Ladder fourni avec le système.

Nous avons observé des bandes non spécifiques apparaissant en dessus ou en dessous des produits d'amplification anticipés sur le gel d'agarose, en particulier une bande faible dans le Multiplex D à approximativement 150 bp, et au dessus du contrôle dans le Multiplex E. Vérifiez que vos contrôles négatifs (aucune amplification d'échantillon d'ADN) ne présentent aucun produit d'amplification par PCR détectable. Tant que vos contrôles négatifs ne présentent aucun produit d'amplification par PCR, ces bandes non spécifiques n'ont aucun effet sur l'analyse. Un signal positif SY133 a été observé chez certains individus ayant une délétion

AZFb confirmée, ce qui suggère que le locus SY133 peut être présent ailleurs dans le chromosome de ces personnes.

6. Références

1. Vollrath, D. *et al.* (1992) The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* **258**, 52-9.
2. Reijo, R. *et al.* (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet.* **10**, 383-93.
3. Foote, S. *et al.* (1992) The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* **258**, 60-6.
4. Affara, N. *et al.* (1996) Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet. Cell. Genet.* **73**, 33-76.
5. Kent-First, M.G. *et al.* (1996) Gene sequence and evolutionary conservation of human SMCY. *Nat. Genet.* **14**, 128-9.
6. Kent-First, M.G. *et al.* (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod. and Dev.* **53**, 27-41.
7. Vogt, P.H. *et al.* (1997) Report of the third international workshop on Y-chromosome mapping 1997. *Cytogenet. Cell Genet.* **79**, 1-20.
8. Skaletsky, H. *et al.* (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**, 825-37.
9. Pryor, J.L. *et al.* (1997) Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New Eng. J. Med.* **336**, 534-39.
10. Kent-First, M.G. *et al.* (1996) The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injections and their fathers. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 943-50.
11. Kostiner, D.R., Turek, P.K. and Reijo, R.A. (1998) Male infertility: Analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Hum. Reprod.* **13**, 3032-8.
12. Kuroda-Kawaguchi, T. *et al.* (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.* **29**, 279-86.
13. Lahn, B.T. and Page, D.C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* **278**, 675-80.
14. Reijo, R. *et al.* (1996) Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* **347**, 1290-3.
15. Repping, S. *et al.* (2002) Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 906-22.
16. Saxena, R. *et al.* (1996) The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat. Genet.* **14**, 292-9.
17. Simoni, M. *et al.* (1999) Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int. J. Androl.* **22**, 292-9.

7. Annexe

A. Composition des tampons et solutions

tampon TBE 1X

89 mM	Base de tris
110 mM	acide borique
2 mM	EDTA

FRANÇAIS

B. Feuilles de résultats

Tableau 1. Profil de produit d'amplification par PCR pour échantillons tests.

Enregistrer la présence (+) ou l'absence (–) de produits d'amplification par PCR pour chaque échantillon expérimental.

Multiplex A Master Mix				Échantillons (+/–)
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte	
SY254	*DAZ*	380	18	
SY157	DYS240	290	20	
SY81	DYS271	209	2	
SY130	DYS221	173	11	
SY182	*KAL-Y*	125	5	
	SMCX	83	Contrôle	

Multiplex B Master Mix				Échantillons (+/–)
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte	
SYPR3	*SMCY*	362	7	
SY127	DYS218	274	9	
SY242	*DAZ*	233	16	
SY208	*DAZ*	140	17	
	SMCX	83	Contrôle	

Multiplex C Master Mix				Échantillons (+/–)
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte	
SY128	DYS219	228	10	
SY121	DYS212	190	6	
SY145	DYF51S1	143	14	
SY255	*DAZ*	124	19	
	SMCX	83	Contrôle	

Multiplex D Master Mix				Échantillons (+/–)
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte	
SY133	DYS223	177	12	
SY152	DYS236	125	15	
SY124	DYS215	109	8	
	SMCX	83	Contrôle	

Multiplex E Master Mix				Échantillons (+/–)
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte	
	ZFX/ZFY	496	Contrôle	
SY14	*SRY*	400	1	
SY134	DYS224	303	13	
SY86	DYS148	232	3	
SY84	DYS273	177	4	

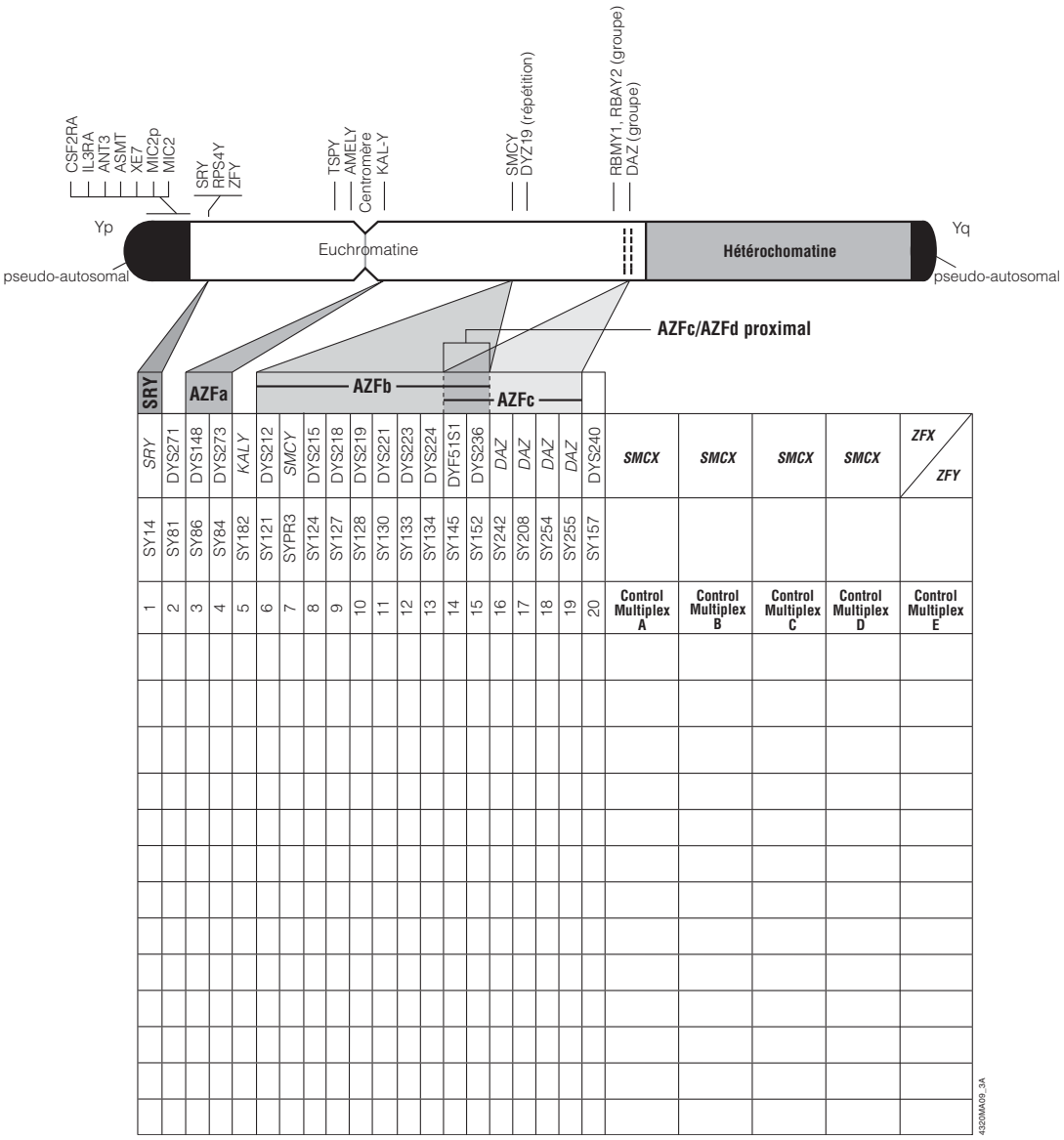


Tableau 2. Feuille de résultats de la carte du chromosome Y. Pour plus de détails, consultez la figure 2 complémentaire de la référence 8. Les palindromes 8, 7, 6, 5 et 4 se cartographient proximals à SY121 et distals à SY182 (1). SY121 est situé à la limite distale de P4 (8). AZFb s'étend de P5 à la région proximale de P1(8). AZFc inclut P1 et P2 (8). Une copie de SY157 au moins est située en dehors de la limite de AZFc. Un signal positif SY133 a été observé chez certains individus ayant une délétion AZFb confirmée, ce qui suggère que le locus SY133 peut être présent ailleurs dans le chromosome de ces personnes.

Promega

[a]U.S. Pat. No. 6,242,235, Australian Pat. No. 761757, Canadian Pat. No. 2,335,153, Chinese Pat. No. ZL99808861.7, Hong Kong Pat. No. HK 1040262, Japanese Pat. No. 3673175, European Pat. No. 1088060 and other patents pending.

© 2012, 2013, 2014 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GoTaq is a registered trademark of Promega Corporation.

GeneAmp is a registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc. Reliant is a registered trademark of CBM Intellectual Properties, Inc. NuSieve is a registered trademark of Lonza Sales AG.

Please contact Promega Technical Services or access our web site at www.promega.com for the most up-to-date information on Promega products.